

誘発突然変異成分の分子機構: 突然変異はDNA複製の誤りか修復の誤りか?

著者	田子 友一朗
号	6
学位授与番号	145
URL	http://hdl.handle.net/10097/44051

	たご ゆういちろう
氏名（本籍地）	田 子 友一朗（群馬県）
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第145号
学位授与年月日	平成21年 3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）分子生命科学専攻
論 文 題 目	誘発突然変異生成の分子機構：突然変異は DNA 複製の誤りか 修復の誤りか？
博士論文審査委員	（主査）教 授 山 本 和 生 教 授 東 谷 篤 志 准教授 日出間 純

論文内容の要旨

DNA 複製の際に一塩基あたりに発生する突然変異の頻度は、 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ と極めて低いレベルに抑えられている。どのようにして複製エラーにより発生する突然変異(自然突然変異)及び紫外線をはじめとした変異原による突然変異(誘発突然変異)を低いレベル、あるいは生体として許容できるレベルに抑えているかを知ることは、生命科学にとって重要な問題である。

大腸菌の DNA ポリメラーゼは、DNA ポリメラーゼ I~V までが確認されている。生体内で特に重要な役割を演じるのは DNA ポリメラーゼ III (Pol III) で、この酵素が DNA の複製を担っている。また、Pol III は複製と同時に自身の複製ミスも修復している。TLS ポリメラーゼは、DNA ポリメラーゼ II (PolB), IV (DinB), V (UmuCD) の総称である。これらタンパク群は、鋳型鎖の損傷により DNA 複製が停止した際に開始される SOS 応答で働く酵素である。TLS による修復により、停止していた複製は再始動できるが、その修復は誤りがちである。これら TLS ポリメラーゼを欠損すると、誤りがちな修復が行われなくなるため *in vivo* の結果で UV 等による変異原に暴露して、損傷を受けても誤りがちな修復ができず、複製フォークが損傷部分でストールして細胞が死んでしまうため変異が発生しなくなる。DNA ポリメラーゼ I (Pol I) は、DNA の複製と修復に関わっている。複製時は、ラギング鎖に作られる岡崎フラグメント RNA プライマーの除去、およびフラグメント間のギャップを埋める役割を担っている。また修復では、損傷を受けた領域に Pol I が結合し、損傷領域を除くときにできるギャップを埋める働きがある。

その他修復経路として、自然突然変異の修復に関わり塩基の挿入ミスを認識するミスマッチ修復系は、MutS タンパク質によって開始される一連の修復系である。また、UV より引き起こされ変異の原因となるピリミジン二量体の修復には Pol V (UmuCD) の他、ヌクレオチド除去修復及び光回復に関わっている。ヌクレオチド除去修復(NER)は UvrABC により開始される修復系で、DNA 損傷によるゆがみを認識すると、損傷を含むオリゴヌクレオチドを切り取り、そのギャップを Pol I もしくは Pol III が埋める、一般的に正確な修復とされている修復系である。光回復は、大腸菌や植物が持っている修復機構であり、UV により受けた傷を光に当たることで光回復酵素が働き正確に修復する。

本研究では、Pol III の *in vivo* での染色体複製の正確性、ならびに自然突然変異生成及び誘発突然変異生成時に Pol I が関わる修復経路の解明を目的とする。

【実験】 Pol III の正確性を調べるために、自然突然変異に関わる修復経路すべてを欠損さ

せた TLS ポリメラーゼ, PolA 及び MutS 欠損株について解析した。次に Pol I の修復への影響を調べるために, PolA 遺伝子を挿入したプラスミド(pWKS30)を導入して Pol I の影響を顕著にし, TLS ポリメラーゼ, PolA, NER に関わる UvrC, TLS の活動を制御する RecA と, それぞれの経路を欠損させた大腸菌株について解析した。

【結果】自然突然変異について各種欠損株の解析の結果, TLS ポリメラーゼは自然突然変異に影響を与えていなかった。polA 欠損は, 変異率が約 20 倍になり, 欠失突然変異, マイナスフレームシフト, 塩基置換の抑制に関わっていた。mutS 欠損は, 変異率が約 30 倍になり, 同一塩基の連続配列でのマイナスフレームシフト, トランジション塩基置換の抑制に関わっていた。Pol III の *in vivo* での染色体複製の正確性は, 2×10^{-6} [mutations/cell/generation]であった。また, Pol III HE による複製はマイナスフレームシフトおよび G:C→T:A トランジション突然変異を頻発していた。

次に Pol I の影響を顕著に観察するため, Pol I 過剰発現させた状態で UV 照射／非照射時の突然変異生成を解析した。その結果を, 図 1 に示す。TLS 欠損株において UV 照射を行った場合, 既往の結果と同様に非照射時から突然変異率の上昇は観察されなかった(図 1C)。しかし, プラスミドにより Pol I を過剰発現させた場合, TLS 欠損下においても変異率が上昇した(図 1A 及び C)。従って, TLS には依存しない Pol I が関係した変異生成経路が存在すると考えられた。この Pol I が関係した変異はシーケンス解析の結果, 特に UV 損傷に起因したピリミジン二量体の部分で高頻度に発生していた。同様の実験系で, NER を行えない *uvrC* 欠損株の場合, Pol I 過剰発現でも変異率の上昇は見られなかった(図 1B) ので, NER に依存している可能性が示された。NER の関与を調べるために光回復を用いた実験を行った。プロリン要求性株について, アミノ酸欠乏緩衝液中で 2 時間培養し, 分裂周期を *ter* の部分で同調させ, 染色体複製が行われず, 染色体複製に依存しない除去修復のみを *in vivo* で行える条件とした。この同調株につき, 次の 3 種類の条件で処理をした。アミノ酸欠乏緩衝液中にて全ての処理を行った。

1) UV 照射後に 37℃で 30 分間インキュベーションし NER を行わせてから, その後 30 分間蛍光灯照射しピリミジン二量体の正確な修復である光回復を行った。

2) UV 照射直後に 30 分間蛍光灯照射し光回復を行った。

3) 光照射処理も NER 処理も行わない。

これら 3 種類全ての場合について, 処理を行った後, 発生した変異を固定するために LB 中で一晚培養を行い複数回複製させた。その結果, 図 2 に示すように, 光回復を優先的に

行わせた 2) の場合、変異の上昇は認められなかったが、NER を優先的に行わせた 1) の場合でも、変異の上昇が認められた。一方、未処理のまま LB 中で一晚培養した 3) の場合、TLS 欠損株は染色体複製が可能な培地条件になっても乗り越え修復が出来ないため変異の上昇は見られなかったが、Pol I を過剰発現させた株では変異の上昇が認められ、NER を優先的に行った場合と同等の変異上昇となった。従って、ここで観察された変異の上昇は、NER によってできたギャップを埋める反応の過程で生じたものと結論づけることができる。Pol I はその 5'→3' エキソヌクレアーゼ活性により、数百塩基の長さを埋めて複製することが知られている(nick translation)。除去修復で切り出された塩基のギャップを Pol I が数百塩基の長さで nick translation する際に、鋳型鎖に UV 損傷があると、TLS のように Pol I が誤りがち乗り越え修復を行う結果、突然変異が上昇すると考えられる。

【まとめ】本研究では、Pol III の複製の正確性および、Pol I の修復の正確性の影響を検討し、以下の知見を得た。

- (1) Pol III の *in vivo* での染色体複製の正確性が明らかになり、 2×10^{-6} [mutations/cell/generation] であった。
- (2) Pol I 過剰発現系で染色体複製・トランスリジョン合成非依存的、ヌクレオチド除去修復依存の変異が発生する。
- (3) Pol I も誤りがちな損傷乗り越え修復を行う。

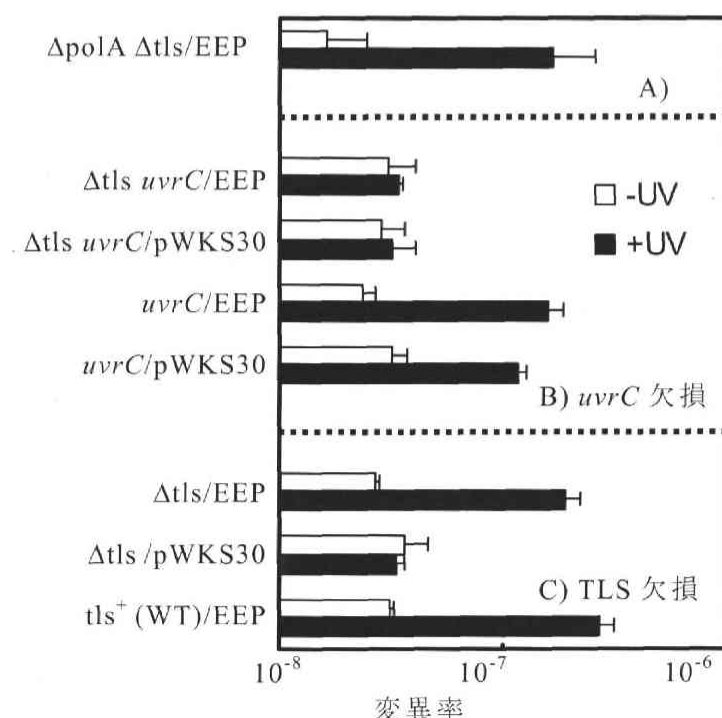


図1 UV照射、非照射時の突然変異率
 $\Delta polA$: Pol I 欠損, Δtls : TLS(*umuCD*)欠損, *recA*: *recA* 欠損,
uvrC: *uvrC* 欠損, EEP: Pol I プラスミド導入株

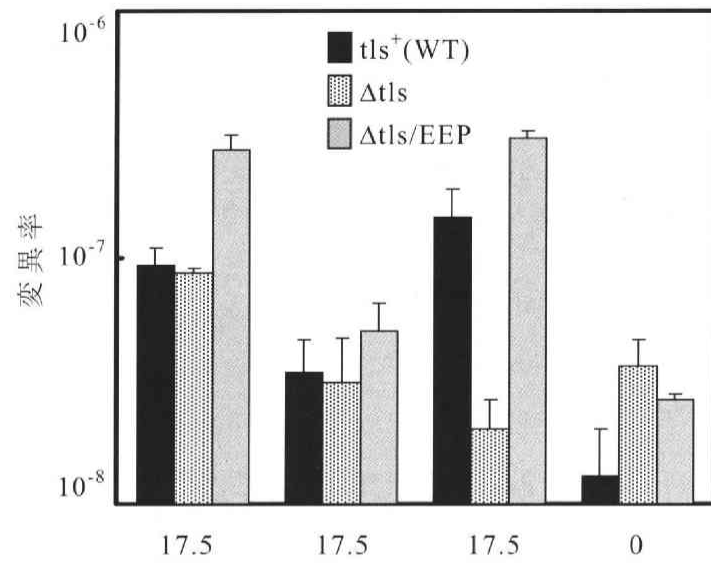


図 2 変異生成のヌクレオチド除去修復依存性(プロリン要求性株)

大腸菌を紫外線照射すると、損傷乗り越え複製酵素が大量に作られ、できた新規複製酵素が損傷を乗り越えながら複製する結果、細胞は死から逃れることができる。損傷乗り越え複製酵素は大腸菌の場合、DNA 複製酵素 II (PolB), IV (DinB), V (UmuCD) の 3 種類知られている。これらタンパク質群は、鋳型鎖の損傷により DNA 複製が停止した際に合成される緊急応答で働く酵素である。損傷乗り越え複製酵素による修復により、停止していた複製は再始動できるが、その修復は誤りがちである。これら損傷乗り越え複製酵素を欠損すると、誤りがちな修復が行われなくなるため、紫外線等に暴露しても誤りがちな修復ができず、複製フォークが損傷部分でストールして細胞が死んでしまうため変異が発生しなくなる。これらの知見から、損傷誘発突然変異は、複製フォークが停止した際に、たとえ間違いを伴っても乗り越えて生存をはかるという戦略の結果生じるものであるというのが共通の認識となっている。紫外線による DNA 損傷は、上で述べた損傷乗り越え複製による修復の他に、uvrABC 遺伝子が関与する除去修復も知られている。uvrABC の一連の作用の次に DNA 複製酵素 I (Pol I) および III (Pol III) の作用によって損傷部位を再複製していると言われている。

田子友一郎は、損傷乗り越え複製が働かなくても、除去修復の過程でも突然変異が生成するのではないかとかんがえ、まず、PolB, DinB, UmuCD のすべての損傷乗り越え複製酵素遺伝子を破壊し、そこで観察される自然突然変異を解析した。次に、紫外線誘発突然変異を調べた所、損傷乗り越え複製酵素がなくても、除去修復が機能して Pol I が過剰になると、突然変異が増加することを証明した。この場合、Pol III が関わる染色体の複製は必要としない。さらに、DNA 複製を停止した条件で、紫外線を照射すると、損傷乗り越え複製に依存しない突然変異の上昇があること、紫外線損傷は除去されていることを明らかにした。以上の結果より、損傷乗り越え複製による突然変異誘発の経路とともに、除去修復の間違いによる突然変異誘発経路があることを明らかにした。

これらの成果は、ゲノム安定性維持機構説明するだけでなく、紫外線誘発皮膚がんの治療等にも貢献するものと期待でき、田子友一郎が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、田子友一郎提出の論文は、博士（生命科学）の学位論文として合格と認める。